

## 博士論文審査報告

(論文題目) 立体構造を基盤としたナイロン加水分解酵素の機能開発と応用

(申請者) 永井 圭介

### 1. 論文内容の要旨

ナイロンは、強靱で、耐熱性、耐薬品性に優れ、繊維・プラスチックとして広く利用されているが、これまで、酵素作用を殆ど受けないと考えられてきた。本論文は、ナイロンの酵素的ケミカルリサイクル、表面加工、および、強度・耐熱性に優れたポリアミドベースの次世代生分解性プラスチック開発のための基礎研究として、ナイロン加水分解酵素の触媒機能と安定性の改良、各種変異酵素の立体構造解析、および、ナイロンの効率的分解条件について検討したものであり、5編7章より構成される。

第1編では、緒論としてナイロン利用の産業・環境分野における動向と、ナイロン加水分解酵素に関するこれまでの研究の概要について述べている。

第2編第1章では、ナイロン加水分解酵素 NylC について、結晶化条件を検討している。まず、タンパク質の沈殿剤として、1.0M クエン酸ナトリウムを用いた結晶化条件を見だし、SPRING-8 における X 線回折実験において解像度 2.0~2.2 Å の回折データの取得に成功している。その後、1.7M リン酸水素二アンモニウムを用いた新たな結晶化条件で、1.05 Å まで解像度を高めている。ナイロンは、各々のポリマー分子鎖が相互に水素結合により安定化しているため、分解性向上のためには、高温反応が望ましい。そこで、第2章では、X 線結晶構造解析から解明した NylC の立体構造を基に、アミノ酸置換を導入し、親型酵素から耐熱性が36℃上昇した変異酵素の取得に成功している。また、構造解析から、i) NylC は、同一モノマーが4分子会合したテトラマー構造をとること、ii) 耐熱性に影響を与える変異の大半が、各モノマー分子の接触界面に位置すること、iii) 熱安定性の高い変異体では、隣接モノマーとの距離が近接しており、より強い分子間相互作用が働いていることを明らかにしている。以上の結果から、サブユニット間相互作用がタンパク質の熱安定性に大きな影響を与え、同酵素の耐熱化の方法として、サブユニット間相互作用の強化が有効であることを明らかにしている。一方、NylC は、不活性な前駆体として細胞内で発現し、その後、自己触媒的な分子内部のポリペプチド鎖の切断と構造変化により、活性型酵素に変換されるという特徴を持つ。第3章では、この自己分断部位、および、その周辺のアミノ酸残基に変異を導入し、分断活性への影響を検討している。さらに、前駆体の X 線結晶構造解析と分子動力学シミュレーションを実施し、自己分断部位の触媒残基(Thr267)側鎖の配向と分断部位までの距離、および、周辺アミノ酸残基との水素結合ネットワークが、本酵素の活性化に重要であること

を明らかにしている。

第3編では、6ナイロンと66ナイロンの基本ユニットの基質認識機構について、重合度の低いオリゴマー分解に関与する酵素 NylB の解析を実施している。同酵素は、基質結合に伴う構造変化により、触媒中心近傍で、水分子が高度に排除され、各触媒サイクルにおいて、アシル中間体形成の効率化に重要な役割を果たす。また、水・*t*-ブタノール混合溶媒中では、加水分解の逆反応により、高収率でアミド合成反応を触媒するという特徴を持つ。そこで、第4章では、密度汎関数理論に基づく第一原理計算により、6 ナイロン基本ユニット(6アミノカプロン酸)のダイマー基質の加水分解反応について、反応の熱力学的パラメータを明らかにするとともに、種々の変異酵素について、反応エンタルピーを示差走査熱量測定により分析している。その結果、アミノ酸置換による触媒中心周辺の構造の相違により、自由エネルギーとして、0 ～ -16 kJ/mol の水排除効果が得られ、実際のアミド合成収率が、理論平衡濃度を上回るという結果を実証している。第5章では、モノマーユニットとして、アジピン酸とヘキサメチレンジアミンから構成される 66 ナイロンとの相互作用を解析するため、各種 NylB 変異体と、アジポイルヘキサメチレンジアミン(66 ナイロン基本ユニット)との複合体の X 線結晶構造解析を行っている。その結果、6 ナイロンのみならず、66 ナイロンのモノマー化を可能にする酵素の基質認識機構を解明している。

第4編第6章では、ナイロン分解評価系として、ポリスチレンベースのマイクロアッセイプレートにナイロン薄膜を形成し、時間経過に伴う膜厚変化と、分解により生じる遊離アミノ基の測定から、固液界面で進行するナイロン分解の反応速度を定量化可能な新規の方法論を確立している。さらに、6ナイロン(工業製品)および、コハク酸ユニットを 30% 共重合させた 66 ナイロンの薄膜が、酵素濃度に依存した一定の速度で分解され、最終的には全て可溶化されることを確認している。この結果は、ポリマーのナイロンが酵素反応のみで完全分解されることを示した事例として、最初のものである。ナイロンのリサイクル化や表面加工では、粒子状・繊維状の固形試料の分解が必要であるため、第7章では、各種脂肪族ナイロン分解の効率化を目的として、前処理と酵素分解との組み合わせを検討している。6ナイロン(工業製品)、及び界面重合法で合成した 56 ナイロンの微粉末化試料について、ギ酸による前処理と、NylB・NylC を用いた酵素反応を組み合わせることで、90%以上の収率で、両ナイロンともモノマー化できることを確認している。以上のように、本研究により、ナイロン分解における酵素側の機能および熱安定性の改良と、生分解性ナイロンの選抜に有効な手法を開発することに成功している。

第5編では、本論文のまとめとして総括を示し、ナイロンの再資源化、表面加工、生分解性ナイロン開発への今後の展望を述べている。

## 2. 論文審査結果の要旨

本論文は、6ナイロン、66ナイロンなどの脂肪族ナイロンの酵素的ケミカルリサイクル、表面加工、および、強度・耐熱性に優れたポリアミドベースの次世代生分解性プラスチック開発のための基礎研究として、ナイロン加水分解酵素の機能・安定性改良、各種変異酵素の立体構造解析、および、ナイロンの効率的分解条件について検討したものである。ナイロンは各ポリマー分子鎖が水素結合により安定化しているため、分解性向上のためには、高温反応が望ましい。そこで、同酵素の立体構造を基に、タンパク質安定化に有望なアミノ酸置換を選出し、耐熱性が上昇した変異酵素を取得するとともに、その熱安定化機構を明らかにしている。また、固液界面で進行するナイロン分解の反応速度を定量化するため、薄膜を用いた酵素分解評価系を構築し、ナイロン薄膜が、最終的には、完全に可溶化されることを確認している。さらに、分解性向上に有効なナイロンの前処理条件、活性発現に必須の酵素前駆体の自己分断機構、6ナイロンと66ナイロンのモノマー化に関与するオリゴマー分解酵素の基質認識機構についても明らかにしている。

これまで、ナイロンの化学的分解として、リン酸触媒存在下で加熱水蒸気を用いる方法、イオン液体を用いて 300℃で加熱する方法、超臨界水で処理する方法などが報告されていたが、何れも高温反応を要する。本研究により、酵素反応による温和な条件での分解が示され、産業分野・環境分野における発展が期待できる。従って、学術上、応用上の意義は高いと判断できる。

本研究内容は、学術論文として3報（筆頭著者 1報）、総説として1報が公表され（何れも査読有り）、国内外で高く評価されている。

よって本論文は博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 26年 1月 29日、論文内容およびそれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

平成 26年 2月 19日

主査	根来 誠司	印
副査	山名 一成	印
副査	今高 寛晃	印
副査	持地 広造	印
副査	柴田 直樹	印